


# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 10237296.9	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/08796	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07.08.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14.08.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N15/05		
Anmelder HEXAL GENTECH FORSCHUNGSGMBH et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Bescheids</li><li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li><li>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li><li>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li><li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li><li>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li><li>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li><li>VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li></ul>		
Datum der Einreichung des Antrags  08.01.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  20.08.2004	
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Goetz, M  Tel. +49 89 2399-8697	



**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

**Beschreibung, Seiten**

1-25 in der ursprünglich eingereichten Fassung

**Ansprüche, Nr.**

1-10 eingegangen am 05.08.2004 mit Schreiben vom 04.08.2004

**Zeichnungen, Figuren**

1-3 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

- |                                |                       |
|--------------------------------|-----------------------|
| 1. Feststellung                |                       |
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche 1 - 10  |
|                                | Nein: Ansprüche       |
| Erfinderische Tätigkeit (IS)   | Ja: Ansprüche 1 - 10  |
|                                | Nein: Ansprüche       |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1 - 10 |
|                                | Nein: Ansprüche:      |

2. Unterlagen und Erklärungen:

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt I**

**Grundlage des Bescheides**

Die eingereichten Änderungen in den Ansprüchen gehen nicht über den Inhalt der Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung hinaus.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Der geänderte Anspruch 1 enthält nunmehr folgende Verfahrensmerkmale:
  - a) Zellseparationsmethodik auf Basis einer Dichtegradientenzentrifugation zur Abtrennung von CK 1-20 exprimierenden Tumorzellen von CK 1-20 exprimierenden Nicht-Tumorzellen (die zusätzliche Angabe "*... wodurch CK-positive von CK-negativen Blutzellen getrennt werden, wobei sich die angereicherten Tumorzellen in der gleichen Fraktion befinden wie die CK-negativen Blutzellen ...*" stellt lediglich eine Beobachtung des erzielten Resultates dar)
  - b) dem Nachweis des epithelialen Tumormarkers CK 1-20 mittels RT-PCR unter Verwendung CK-spezifischer Primer.
2. Folgende Dokumente werden als besonders relevant erachtet:

**D1:** WO0046585, 10. August 2000 (2000-08-10)

**D2:** GOETZ et al., PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, Bd. 43, März 2002 (2002-03), Seite 733 , zusammen mit der entsprechenden Posterpräsentation, zu entnehmen online unter den URLs  
<http://www.hexal-gentech.de/products/pub/index.html>  
<http://www.hexal-gentech.de/products/pub/pdf/poster1.pdf>

**D7:** WO9617080, 6. Juni 1996 (1996-06-06)
3. Die dem Dokument **D2** zugeordneten Posterpräsentation zeigt in Fig. 1 samt Begleittext (der dem Abstract GOETZ et al. entspricht) ganz deutlich das Oncoquick™-System zur Dichtegradientenzentrifugation und Anreicherung von

z.B. Tumorzellen. Ebenso deutlich wird die anschliessende Charakterisierung von epithelialen Tumorzellen mittels **RT-PCR von Zytokeratin 20 als eine von fünf möglichen Nachweisverfahren** neben ICC, Durchflusszytometrie, Zellkultur und FISH gezeigt.

Der Gegenstand des Anspruchs 1 stellt daher eine Selektion bezüglich des CK-20 Nachweisverfahrens dar; Anspruch 1 ist daher neu (Art. 33(2) PCT).

4. **D7** offenbart ein Verfahren zur Beantwortung der Frage, ob ein Patient einen Tumor hat, bzw. ob der Tumor metastasiert ist. Gemäss **D7** ist der Marker CK-20 in Blut oder Knochenmark von einem nicht an einem Tumor erkrankten Menschen nicht vorhanden (**D7**, Seite 6, Zeilen 8 - 11). Daher kann durch die Bestimmung von CK-20 im Blut eines Patienten bestimmt werden, ob dieser Patient an einem metastasierenden Tumor erkrankt ist (Seite 4, Zeilen 18 - 25). Die Vorschaltung eines speziellen Reinigungsverfahrens ist in **D7** nicht erforderlich.

Nach der Lehre von **D7** muss der Fachmann erwarten, dass sich im Blut von Patienten gegebenenfalls nur CK-20 positive Tumorzellen befinden. Falsch-positive Ergebnisse durch Blutzellen würde der Fachmann aufgrund der Lehre von **D7** nicht erwarten.

Im Rahmen der Erfindung wurde festgestellt, dass auch bei tumorfreien Blutproben falsch-positive CK-20 Expression aufgrund von illegitimer Transkription oder von Pseudogenen festgestellt werden kann. Es wurden Vergleichsversuche durchgeführt, wobei zur Abreicherung dieser falsch-positiven CK-Zellen eine Ficoll®-Zentrifugation mit der erfindungsgemässen Anreicherung von Tumorzellen mit Hilfe der OncoQuick®-Zentrifugation verglichen wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Beschreibung auf den Seiten 19 bis 21 dargestellt.

Überraschenderweise konnte mit Hilfe der OncoQuick®-Technologie das Ergebnis ganz erheblich verbessert werden: Bei 30 tumorfreien Blutproben wurden nach Ficoll®-Zentrifugation noch drei falsch-positive Proben (= 10%) festgestellt. Mit dem erfindungsgemässen Verfahren wurden aber alle falsch-positiven Ergebnisse abgetrennt.

Im Hinblick auf die somit vermeidbaren Kosten und psychische Belastung von zu untersuchenden Patienten durch falsch-positive Ergebnisse stellen die durch die erfindungsgemässe Technologie erzielbaren Ergebnisse einen erheblichen

Fortschritt in der Diagnostik dar, der die dem Anspruch 1 zugrunde liegende erfinderische Tätigkeit begründet.

Anspruch 1 erfüllt daher auch die Erfordernisse gemäss Art. 33(3) PCT.

5. Eine analoge Analyse gilt auch für die abhängigen Ansprüche 2 - 7 sowie den Kit gemäss Ansprüchen 8 - 10. Die genannten Ansprüche sind ebenfalls neu und beruhen auf erfinderischer Tätigkeit (Art. 33(2) und (3) PCT).

PCT/EP03/08796  
HEXAL Gentech ForschungsGmbH

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, bei dem Nicht-Tumorzellen, die wenigstens eines der Zytokeratine 1-20 exprimieren, von Tumorzellen, die wenigstens eines der Zytokeratine 1-20 exprimieren, abgetrennt werden, worin
  - (a) Tumorzellen angereichert werden, indem ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,055 bis 1,065 g/ml aufweist, mit der Körperflüssigkeit überschichtet wird und zentrifugiert wird, wodurch Zytokeratin-positive von Zytokeratin-negativen Blut-Zellen getrennt werden, wobei sich die angereicherten Tumorzellen in der gleichen Fraktion befinden wie die Zytokeratin-negativen Blut-Zellen; und
  - (b) bestimmt wird, ob die angereicherten Zellen einen epithelialen Marker exprimieren, der Zytokeratin ist, dadurch gekennzeichnet, dass man mRNA aus den angereicherten Zellen revers transkribiert und eine PCR mit wenigstens einem Zytokeratin-spezifischen Primer durchführt, wobei das Zytokeratin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Zytokeratin 1 bis 20.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt wird, das durch eine poröse Barriere, einen Filter, ein Sieb oder eine Klappe in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt wird und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die poröse Barriere, der Filter, das Sieb oder die Klappe eine Dicke von 0,5-10 mm, vorzugsweise von 1-5 mm aufweisen.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die poröse Barriere, der Filter, das Sieb oder die Klappe eine Porengröße von 20-100 µm, vorzugsweise 20-30 µm aufweisen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die poröse Barriere, der Filter, das Sieb oder die Klappe aus einem hydrophoben Material bestehen oder mit einem hydrophoben Material beschichtet sind.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Zellseparationsmedium einen Farbstoff enthält, der das Zellseparationsmedium von der darüberliegenden Körperflüssigkeit farblich unterscheidbar macht und dadurch die Lokalisation der Interphase vereinfacht.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt (b) in Einzel- oder Kombinationsanalyse bestimmt wird, ob die angereicherten Zellen wenigstens einen epithelialen Marker, nämlich eines der Zytokeratine 1-20 exprimieren.
8. Kit enthaltend ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,055-1,065 g/ml aufweist, und Mittel zum Nachweis der Expression des epithelialen Markers Zytokeratin, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zum Nachweis der Expression von wenigstens einem der Zytokeratine 1-20 ausgewählt ist aus Zytokeratin-spezifischen Primern.
9. Kit nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass weiterhin ein Waschpuffer, gegebenenfalls in konzentrierter Form, zum Waschen der angereicherten Zellen enthalten ist.
10. Kit nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass weiterhin wenigstens ein Zentrifugationsgefäß enthalten ist.



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/EP03/08796

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, Charles Edward SITCH BA,

Deputy Managing Director of RWS Group Ltd UK Translation Division, of Europa House,  
Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare:

That the translator responsible for the attached translation is knowledgeable in the German  
language in which the below identified international application was filed, and that, to the  
best of RWS Group Ltd knowledge and belief, the English translation of the amended sheets  
of the international application No. PCT/EP03/08796 is a true and complete translation of the  
amended sheets of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all  
statements made on information and belief are believed to be true; and further that these  
statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made  
are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United  
States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent  
application issued thereon.

Date: January 13, 2005

Signature :



For and on behalf of RWS Group Ltd

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,  
Gerrards Cross, Buckinghamshire,  
England.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2003/008796



# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 10237296.9	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP2003/008796	International filing date (day/month/year) 07 August 2003 (07.08.2003)	Priority date (day/month/year) 14 August 2002 (14.08.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 15/05, 33/574		
Applicant HEXAL GENTECH FORSCHUNGSGMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 January 2004 (08.01.2004)	Date of completion of this report 20 August 2004 (20.08.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP2003/008796

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-25 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 1-10 \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 04 August 2004 (04.08.2004)
- ☒ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ 1-3 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 03/08796

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The filed amendments to the claims do not go beyond the content of the application as filed.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 03/08796

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

1. The amended claim 1 now contains the following process features:

a) cell separation method based on density-gradient centrifugation to separate CK1-20-expressing tumour cells from CK1-20-expressing non-tumour cells (the additional statement "... whereby CK-positive blood cells are separated from CK-negative blood cells, wherein the enriched tumour cells are present in the same fraction as the CK-negative blood cells..." represents merely an observation of the result achieved);

b) detection of the epithelial tumour cell markers CK1-20 by RT-PCR using CK-specific primers.

2. The following documents are considered especially relevant:

D1: WO0046585, 10 August 2000 (2000-08-10)

D2: GOETZ et al., PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 43, March 2002 (2002-03), page 733, together with the corresponding poster presentation, which may be accessed online at the following URLs:

<http://www.hexal-gentech.de/products/pub/index.html>  
<http://www.hexal-gentech.de/products/pub/pdf/poster1.pdf>  
D7: WO9617080, 6 June 1996 (1996-06-06)

3. The poster presentation associated with D2 (figure 1 and accompanying text (which corresponds to the abstract GOETZ et al.)) clearly shows the OncoQuick™ system for density-gradient centrifugation and enrichment of, for example, tumour cells. The subsequent characterization of epithelial tumour cells by **cytokeratin 20 RT-PCR detection** is shown equally clearly to be one of the **five possible detection processes** (with ICC, flow cytometry, cell culturing and FISH).

The subject matter of claim 1 therefore represents a selection in relation to the CK20 detection process and claim 1 is therefore novel (PCT Article 33(2)).

4. D7 discloses a process for determining whether a patient has a tumour or the tumour has metastasized. According to D7, the CK20 marker is not present in blood or bone marrow from a person who does not suffer from a tumour (D7, page 6, lines 8-11). Therefore, by determining the presence of CK20 in the blood of a patient, it is possible to determine whether a metastatic tumour is present (page 4, lines 18-25). A special preliminary washing process is not required in D7.

According to the teaching of D7, a person skilled in the art has inevitably to anticipate that only CK20-positive tumour cells may be present in a patient's blood. Proceeding from the teaching of D7, a person skilled in the art would not expect blood cells to

produce false-positive results.

The applicant has established that illegitimate transcription or pseudogenes may produce false-positive findings with respect to CK20 expression, even in tumour-free blood samples. The results of comparisons between Ficoll® centrifugation to deplete these false-positive CK cells and the enrichment of tumour cells by OncoQuick® centrifugation as per the invention are presented on pages 19-21 of the description.

Surprisingly, the quality of the findings was appreciably improved by the use of OncoQuick® technology: whereas three of 30 tumour-free blood samples (10%) still yielded false-positive results after Ficoll® centrifugation, the process as per the invention completely eliminated false-positive findings.

In light of the consequent potential cost savings and the stress imposed on patients by false-positive findings, the results permitted by the technology as per the invention represent an important advance in diagnostic techniques that substantiates the inventive step of claim 1.

Claim 1 therefore meets the requirements of PCT Article 33(3).

5. Similar considerations apply to dependent claims 2-7 and to claims 8-10, which pertain to the kit. These claims are likewise novel and involve an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).